

Az ultraszonikus-, ultraibolya- és röntgen-sugárzás hatása az adenozin trifoszfátra (ATP)

GARAY KÁROLY ÉS GUBA FERENC

Agrokémiai Kutató Intézet Biokémiai osztálya, Budapest

A különböző sugárzások biológiai hatása általánosan ismeretes. Sok kísérlet utal arra, hogy a sugárzások az élő szervezet energia háztartásában is okoznak változást, a szintetizáló folyamatokat befolyásolják. Így pl. GARAY (FRENÝÓ-tól vett idézet) (4) 1947-ben különböző csiránövények tenyészcucsait sugározta be ultrahanggal és 30-50%-os növekedés serkentést észlelt. Másrészről ismeretes, hogy az energia háztartás, a szintetizáló folyamatok egyik fontos anyaga, a nagyenergiájú foszfátészter kötést tartalmazó ATP. GUBA (6) kimutatta, hogy a kukorica csírányövény tartalmaz ATP-t. Kézenfekvőnek látszott megvizsgálni különböző sugár-fajták izolált ATP-oldatra való hatását.

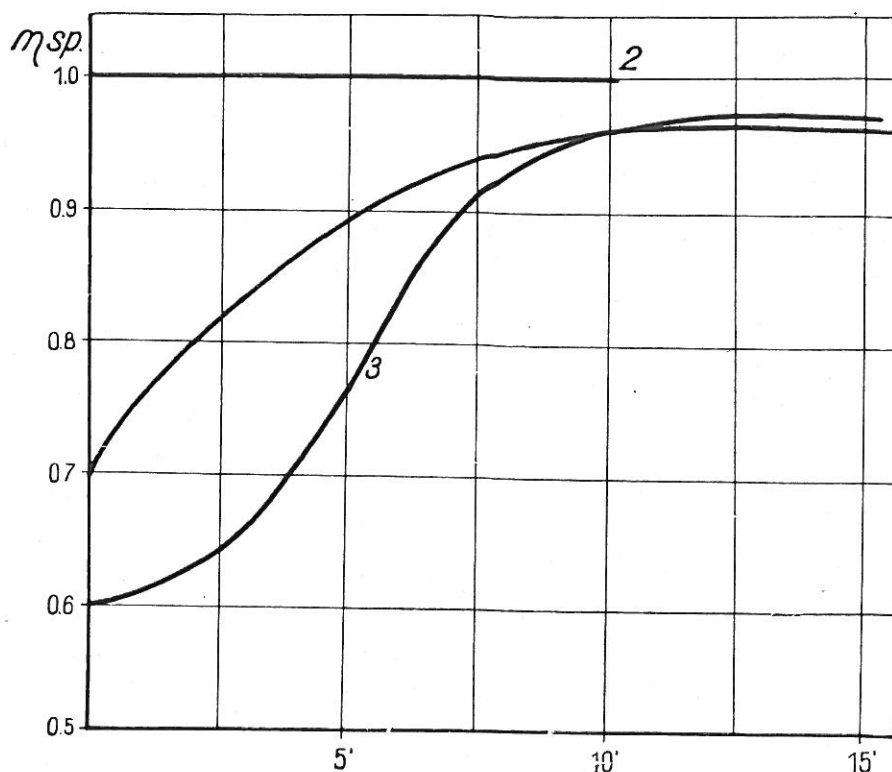
Jelen dolgozatunkban ilyen irányú kísérleteinkről kívánunk beszámolni.

A kísérletekben használt anyagok, eszközök és módszerek leírása

A besugárzott ATP-oldat fényabszorpcióját és enzimátikus hasítóságát vizsgáltuk. Ez utóbbi vizsgálatban STRAUB F. B. és munkatársainak (2) B-miozinos módszerét alkalmaztuk. Egyes esetekben megvizsgáltuk a B-miozin által lehasított P mennyiségét FISKE és SUBAROW szerint (3).

Kísérleteinkben az ATP Na-sóját használtuk, mely a Richter Vegyészeti gyárban készült. A söt szilárd poralakban állandóan exikkátorban tartottuk. Az ATP-ből 10—100 mg/ml-s törzsoldatot készítettünk, melyet állandóan hideg szobában, ill. jégszekrényben, jegesvízben 0 C°-n tartottunk. Ebből a törzsoldatból készítettük közvetlenül a sugárzás előtt 1-2 perccel az 50 gramma/ml koncentrációjú ATP-oldatot. A sugárzásra kerülő ATP-oldatok mindig 50 gramma/ml koncentrációjúak voltak.

A B-miozint (BM) nyúlizomból nyertük BANGA és SZENT-GYÖRGYI (1) eljárása szerint. Ez különösebb változás nélkül 0 C°-on a a készítés napjától 7-10 napig eltartható. Ennél idősebb anyagot sohasem használtunk. Ebből a törzsoldatból készítettünk közvetlenül a hasítási kísérletek megkezdése előtt megfelelő hígítást a következő arányban: 1 rész BM törzsoldat 2-4 rész 0.5 M KCl. 0,8 rész M/5 pH 7,4 foszfát, illetve 7,9 pH-ju veronál-acetát puffer. Az ilyen hígítású BM oldatból vettünk 1,5 ml-t a viszkoziméterbe és adtuk hozzá a vizsgálatra kerülő ATP oldat 1 ml-ét.



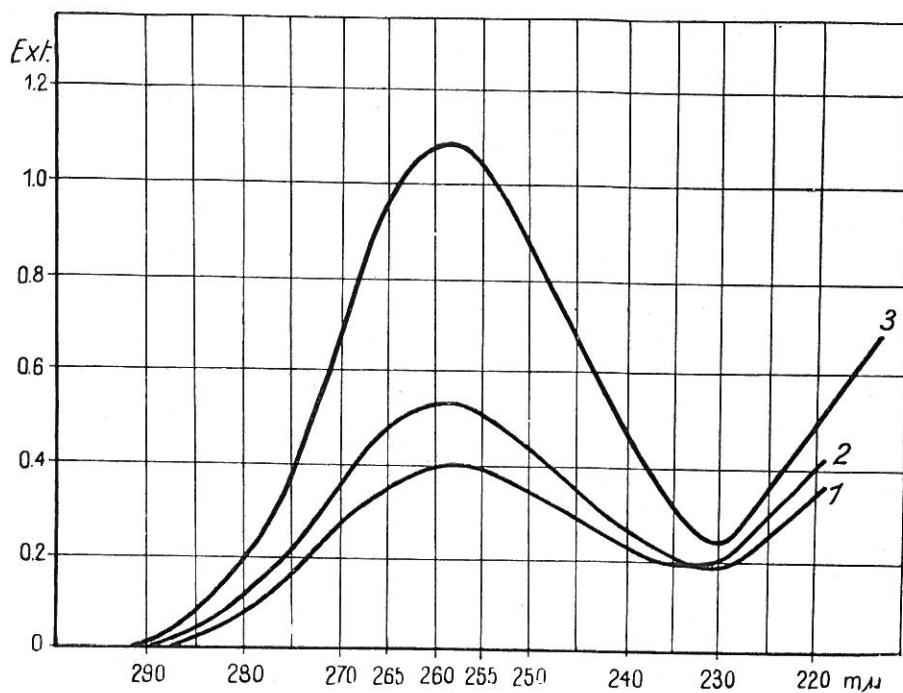
I. a. Ultrahang hatása az ATP hasíthatóságára

A kísérletekhez használt oldatok készítéséhez oldószerül $2\times$ üvegben desztillált vizet használtunk.

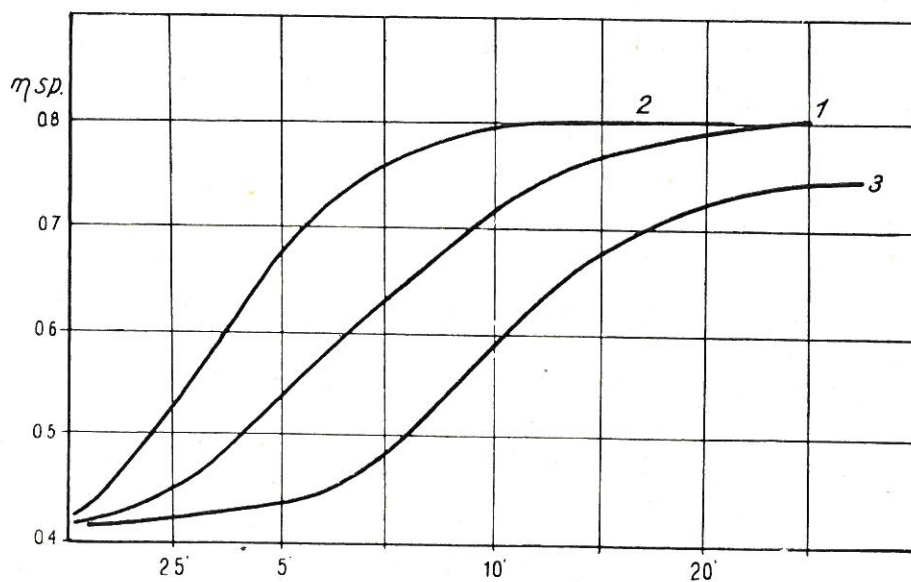
A viszkozitásméréseket $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on OSTVALD-féle viszkoziméterrel végeztük. Ennek méretei olyanok, hogy $0,5\text{ M KCl}$ és $\text{M}/5\text{ pH } 7,4$ foszfát-puffer előbb jelzett keverési arányban történt elegyéből (BM helyett $0,5\text{ M KCl}$) $2,5\text{ ml}$ kifolyási ideje 50 sec .

Az ATP-oldatok spektrofálása BECKMAN-féle spektrofotométerrel történt, az Élelmezéstudományi Intézetben. A BECKMAN-féle spektrofotométerrel való abszorpciós spektrogrammok felvétele 5 ml vizsgáló oldattal $0,5\text{ mm}$ -es rés, közepes érzékenység és 1 cm széles kvarcküvetta használata mellett. (A spektrogrammok felvételében nyújtott segítségért ehelyütt is köszönetet mondunk Dr. JASCHIK SÁNDOR vegyész kartársnak.)

Az ultrasonikus (US) sugárzást egyikünk által már régebben épített kvarcgenerátorral állítottuk elő (5). A most használt készülék a régebbitől annyiban tér csak el, hogy most $6\text{ cm } \varnothing$ planparellez kvarc-lemez adja az US-sugárzást. A kvarcra folyó magasfrekvenciás áram feszültsége 15 KV , intenzitása minden esetben $400\text{ mA } 300\text{ kiló ciklus}$

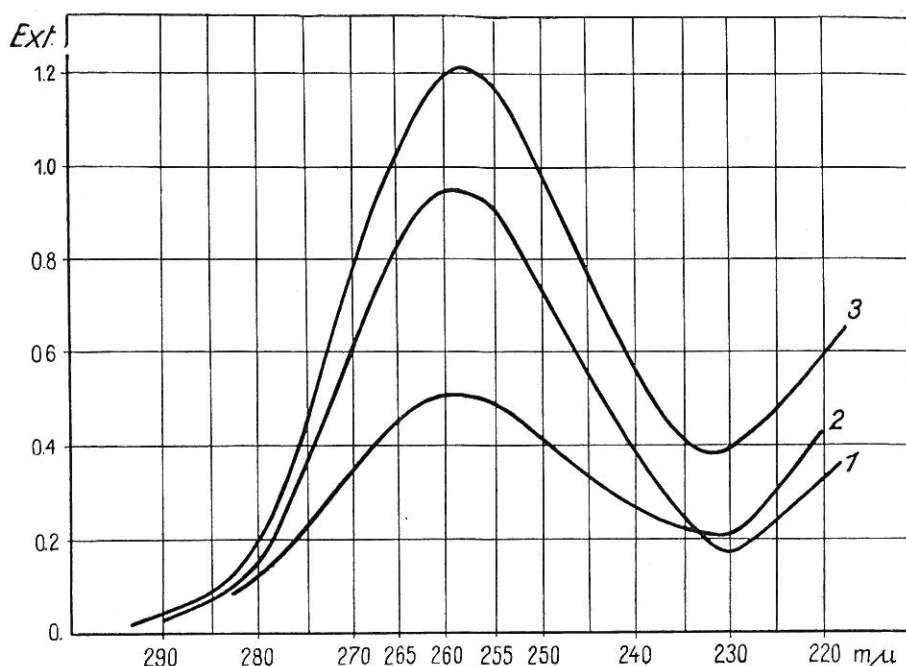


I. b. Ultrahang hatása az ATP abszorpciós spektrumára



II. a. Ultraibolya fény hatása az ATP hasíthatóságára

mellett. A kvarclemezt legfinomabb transzformátor olajban, illetve néhány esetben finom paraffinolajban van. Ebbe az olajba merül a sugárzásra kerülő ATP-oldatot tartalmazó speciálisan kiképzett üvegedény, melynek gömbölyű feneke a kvarclemeztől 5 cm távolságban van. Az üvegedény hűtőköpennyel van ellátva. Besugárzás alatt ebben állandóan jeges víz volt, úgy, hogy az ATP-oldat hőmérséklete sohasem emelkedett 10°C fölé.



II. b. Ultraibolya fény hatása az ATP abszorpciós spektrumára

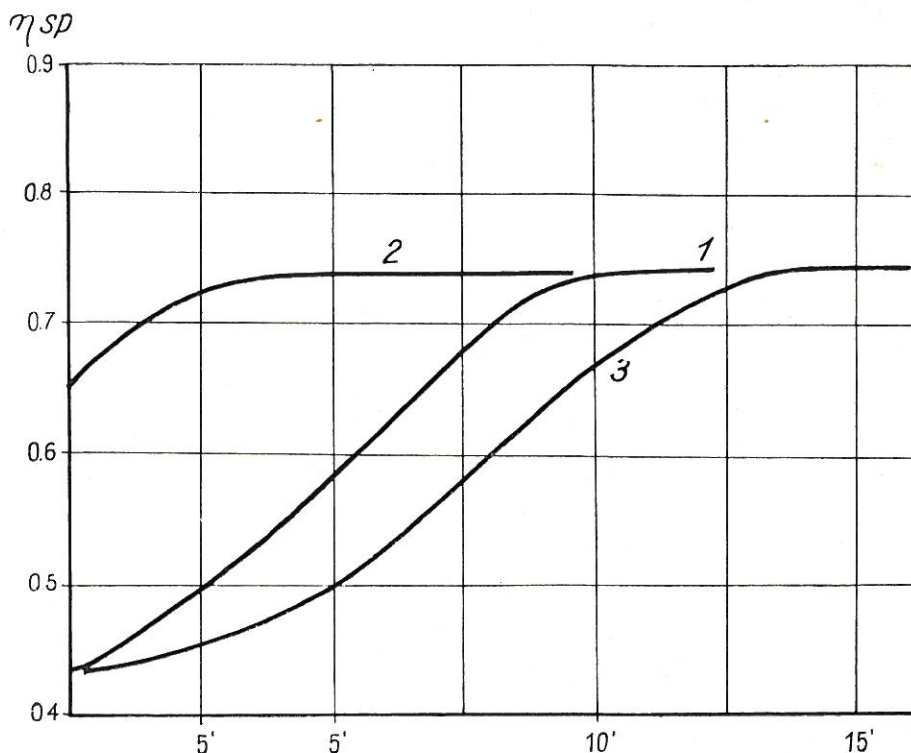
- 1 A röntgen (RTG) sugárzást egy SIEMENS-gyártmányú, az orvosi
- 2 terápiás gyakorlatban kontakt-terápiára használatos CHAOUL-féle RTG
- 3 használt 50 gamma/ml koncentrációjú ATP-oldatot (R-ATP.) A nyert
- 4 Az ultraibolya (UV) sugárzás előállítása 500 wattos HANNAU-
- 5 dozisráta mellett és 5 cm \varnothing fémtubussal.
- 6 típusú UV-csővet használtunk. Az UV-cső távolsága az ATP-oldat fel-
- 7 színétől 15 cm volt. Szűrőket nem alkalmaztunk. Állandó hűtésről gondos-
- 8 kodtunk, melynek következtében az ATP-oldat hőmérséklete 10°C
- 9 alatt maradt.

Kísérleti eredmények és következtetések

- 11 valamint üvegben desztillált vizet sugároztunk be azonos körülmények
- 12 között. A besugárzott vízzel az ATP-törzsoldatból elkészítettük az állandóan
- 3 készülék szolgáltatva. 60 KV, 4mA 5 cm fókusz-távolsággal, 210 r/perc
- 10 Kísérleteinkben 50 gamma/ml koncentrációjú ATP-oldatot (S-ATP),

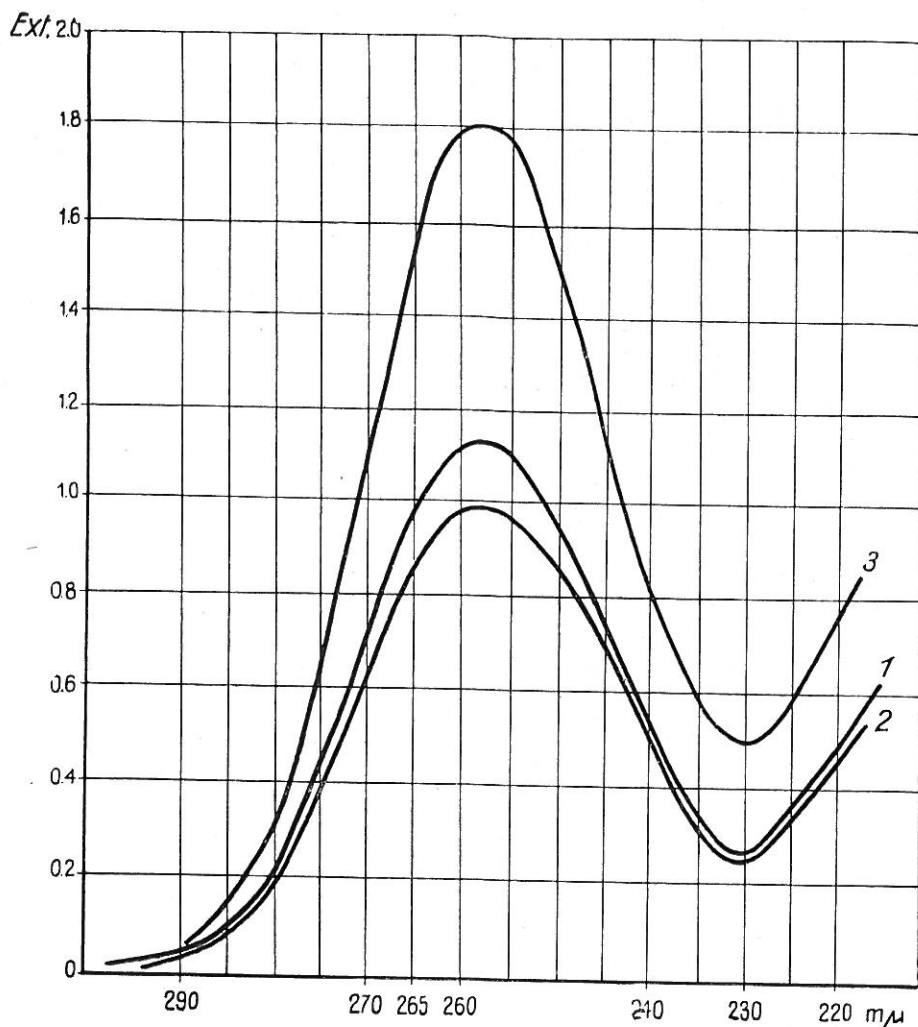
44 S-ATP és R-ATP-oldatok fényabszorpcióját és enzimátikus hasítható-
 15 ságát összehasonlítottuk a kontroll ATP-vel.

Az Ia és Ib ábrán láthatjuk az US-sugárzással kezelt ATP hasítási görbéjét és spektrogrammját. A IIa és IIb ábrán az UV-sugárzással kezelt ATP hasítási görbéjét és spektrogrammját. A IIIa és IIIb ábrán pedig az RTG-sugárzással kezelt ATP ilyen viselkedését. Azt látjuk, hogy mind



III. a. Röntgensugárzás hatása az ATP hasíthatóságára

a három sugárféleséggel kezelt ATP-oldat (S-ATP) a sugárzások hatására úgy változott meg, hogy a BM ATP-ase enzimje által az ATP-ről lehasítható foszfátgyök hasítási ideje nagymértékben megrövidült (2-görbék). Ezzel szemben akkor, amikor nem az ATP-oldatot, hanem csak az oldószert, vagyis a vizet sugároztuk be, akkor ennek hatására az ATP úgy változott meg, hogy lassan hasíthatóvá vált a BM számára. (R-ATP) (3-s görbék). Ezt a kísérletet azért vezettük be, hogy megállapítsuk: vajon nem a sugárzás hatására a vízben keletkező különböző szabadgyökök aktiválják a BM ATP-ázát. Azt találtuk, hogy ezek nem aktiválják az ATP-ázát, mert az R-ATP-vel rögtön a sugárzás után történt hasítási vizsgálat ugyanolyan lefutású görbét adott, mint az ugyanannyi ideig jegesvízben állt kontroll ATP (1-s görbék). Ha a vízben a sugárzás hatására keletkező szabadgyökök aktiváltak volna az ATP-ázát, akkor rögtön a sugárzás után

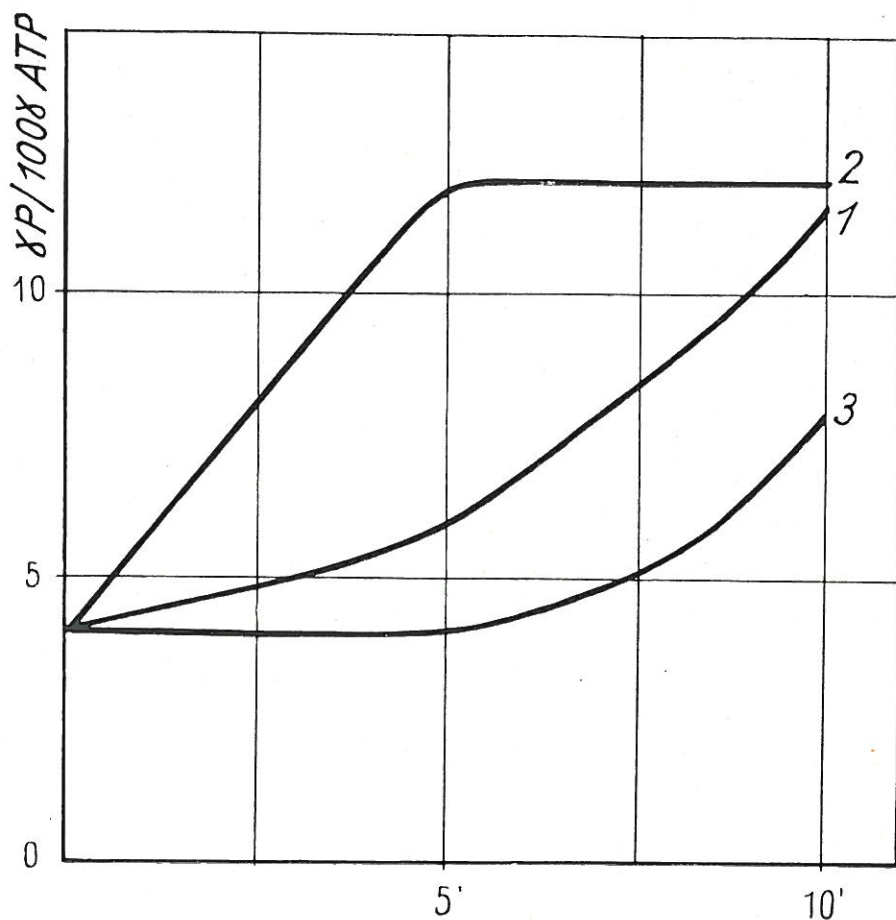


III. b. Röntgensugárzás hatása az ATP abszorpciós spektrumára

elvégzett hasítási vizsgálatkor lett volna várható, hogy a még jelenlévő szabadgyökök a legnagyobb mértékben aktiválják az ATP-át és ennek fokozott ATP-hasításban kellett volna jelentkeznie. Hogy az ATP-n történik-e a sugárzás hatására szerkezetbeli megváltozás, ezt a BECKMAN-féle spektrofotométerrel felvett abszorpciós spektrogrammokról kívántuk eldönteni. Mint adenin-származéknak az ATP-nek abszorpciós maximuma a 260 mμ-os sávban van. Láthatjuk az abszorpciós görbékből, hogy a sugárzással kezelt kétfajta ATP-nek konstitúciójában lényeges eltérés van a kontrolléhoz képest. Ezek a görbék jellegzetesek és hozzárendelhetők a hasítási görbékhez: akkor, amikor az ATP a sugárzás hatására nagymértékben hasíthatóvá válik, akkor az abszorpciós maximum extinkciója

nagymértékben csökken (2-s görbék), akkor pedig amikor az ATP lassan hasíthatóvá válik az extinkció mindhárom esetben nagymértékben növekszik (3-s görbék).

Meg kell jegyeznünk, hogy abban az esetben, amikor az R-ATP hasítási görbéje együtt futott a kontroll ATP hasítási görbéjével (1-s görbék), akkor az abszorpciós spektrogrammban sem volt a kettő között



IV. A B-myosin által 100 gamma ATP-ről lehasított P-mennyisége

lényeges eltérés, ami arra utal, hogy a hasíthatóság és a szerkezet között szoros összefüggés van.

Az enzimhasítási görbéket az abszorpciós görbékkel összevetve, felmerül annak a lehetősége, hogy a sugárzás következtében az ATP elbomlik. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk az ATP-oldatok szeretlen P-tartalmát a BM-hasítás 0, 5, 10. percében. Az enzimfolyamatot 5%-os triklorcetsavval leállítottuk, a kicsapódott fehérjét leszűrtük és a szűredek meghatározott részéből FISKE és SUBBAROV módszerével foszfátot

határoztunk meg. A kapott eredmények jól egyeztek a viszkozitási görbékkel. A 0. percben a szervetlen P-értékek teljesen azonosak voltak jeléül annak, hogy nem ATP-destrukcióról van szó. A hasítás előhaladtával, ott ahol a viszkozitási görbe jobban emelkedett, több volt a lehasadt foszfát, mint ott, ahol laposan futó viszkozitási görbe volt. Egy ilyen P-meghatározási görbét mutat a IV. ábra, mely UV sugárzásra vonatkozik és a IIa ábrával vethető össze.

A kísérleti eredmények jól mutatják, hogy a sugárzásoknak van hatásuk az ATP-re. Ez a hatás különböző aszerint, hogy az ATP-oldat közvetlenül kerül sugárzásra, vagy az ATP csak besugárzott oldószerrel kerül össze. Ennek okaira vonatkozó kísérleteinkről a későbbiekben számolunk be.

Egyben lehetséges, hogy közelebb jutottunk annak a régi problémának megoldásához, hogy miért van az, hogy amíg az izomban nagymennyiségű ATP van, az ott változást csak ingerhatásokra okoz, addig ha kipreparált ATP-ből néhány gammát adunk az izomhoz, akkor hatalmas kolloidkémiai változást tapasztalunk.

Összefoglalás

Megvizsgáltuk az ultraszonikus-, ultraibolya- és röntgensugárzás ATP vizes oldatára való hatását.

A vizsgált sugárfajták az ATP enzimatis hasíthatóságát nagymértékben befolyásolják.

A sugárzás hatására az ATP-oldatok spektruma is megváltozik. Valószínűleg a sugárzás az ATP szerkezetét változtatja meg.

Érkezett: 1951 június 2.

Irodalom

1. BANGA I. & SZENT-GYÖRGYI A.: Preparation and properties of myosin A and B.: Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged I. 5. 1941-42.
2. FEUER G., MOLNÁR F., PETTKÓ E. & STRAUB F. B.: Hung. Acta Physiol. 1. 150. 1948.
3. FISKE H. C. & SUBBAROV V. J.: Biol. Chem. 66. 375 1925.
4. FRENYÓ V.: Természettudomány 2. 331. 1947.
5. GARAY K. & BERTA L.: Magyar Orvosi Archivum 44. 4. 1943.
6. GUBA F.: Agrokémia és Talajtan 1. 11. 1951.

Влияние ультразвукового, ультрафиолетового и рентгеновского излучения на аденозинтрифосфат (АТФ)

К. Гараи и Ф. Губа.

Биохимический Отдел Агрохимического Исследовательского Института, Будапешт.

ВЫВОДЫ

Исследовалось влияние ультразвукового, ультрафиолетового и рентгеновского излучения на водный раствор АТФ.

Проверенные виды излучения оказали большое влияние на ферментативную расщепляемость АТФ.

Под влиянием указанных излучений изменяется и спектр растворов АТФ.

Повидимому, излучение изменяет структуру АТФ.

Рисунки:

- I. а. Влияние ультразвука на расщепляемость АТФ.
 - I. б. Влияние ультразвука на спектр поглощения АТФ.
 - II. а. Влияние ультрафиолетового света на расщепляемость АТФ.
 - II. б. Влияние ультрафиолетового света на спектр поглощения АТФ.
 - III. а. Влияние рентгеновского излучения на расщепляемость АТФ.
 - III. б. Влияние рентгеновского излучения на спектр поглощения АТФ.
 - IV. Количество фосфора, отщепленного из 100 γ АТФ миозином-В.
- Кривые № 1: Контрольный АТФ; № 2: Кривые облученного раствора АТФ (Ш-АТФ); № 3: Кривые облученного разбавленного водно раствора АТФ (Р-АТФ).

The Effect of Ultrasonic-, Ultraviolet- and X-rays on ATP

K. GARAY & F. GUBA

Biochemical dept. of Agrochemical Research Inst., Budapest

Summary

The effect of Ultrasonic-, Ultraviolet- and X-ray radiations on ATP-solution has been investigated.

The enzymatic splitting of ATP is affected very much by the examined radiations.

The absorption spectra of ATP-solutions also undergo a change.

Probably the structure of ATP is altered by the radiations.

Explanation to the figures:

- I. а. Effect of US on the splitting of ATP
 - I. б. Effect of US on the absorption spektra of ATP
 - II. а. Effect of UV on the splitting of ATP
 - II. б. Effect of UV on the absorption spektra of ATP
 - III. а. Effect of X-ray on the splitting of ATP
 - III. б. Effect of X-ray on the absorption spektra of ATP
 - IV. Amount of P in gamma splitt off by myosin B from 100 gamma ATP.
- Curves n. o. 1 indicate the control ATP
Curves n. o. 2 indicate the radiated ATP solution
Curves n. o. 3 indicate the ATP solution prepared with irradiated water.

Die Einwirkung von Ultraschall-, Ultraviolett- und Röntgenstrahlen auf ATP.

K. GARAY & F. GUBA

Biochemische Abteilung des Agrochemischen Forschungsinstitutes Budapest

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluss von Ultraschall-, Ultraviolett- und Röntgenstrahlen auf ATP-Lösungen studiert.

Die enzymatische Spaltung von ATP wird durch die genannten Strahlungen stark beeinflusst. Die Absorptionsspektren von ATP-Lösungen werden verändert. Wahrscheinlich erfolgt eine Umsetzung in der Struktur von ATP, durch Strahlenwirkung.

Erklärung zu den Figuren.

- I. a. Einfluss von US auf die Spaltung von ATP.
- I. b. Einfluss von US auf das Absorptionsspektrum von ATP.
- II. a. Einfluss von UV auf die Spaltung von ATP.
- II. b. Einfluss von UV auf das Absorptionsspektrum von ATP.
- III. a. Einfluss von Röntgenstrahlen auf die Spaltung von ATP.
- III. b. Einfluss von Röntgenstrahlen auf das Absorptionsspektrum von ATP.
- IV. Phosphorsäuremenge in Gamma, abgespaltet durch Myosin B aus 100 Gamma ATP

Kurven No. 1. beziehen sich auf unbestrahltes ATP.

Kurven No. 2. beziehen sich auf bestrahltes ATP.

Kurven No. 3. beziehen sich auf ATP-Lösung, hergestellt mit bestrahltem Wasser.

Helyreigazítás

Az »Agrokémia és talajtan« 1. számának 4. oldalán az ábra alatti szövegrészben — az 5. oldal első bekezdéséig — a sorok sajnálatos nyomdahiba következtében felcserélődtek.

A helyes szöveg a következő:

A röntgen (RTG) sugárzást egy SIEMENS-gyártmányú, az orvosi terápiás gyakorlatban kontakt-terápiára használatos CHAOUL-féle RTG készülék szolgáltatta. 60 KV, 4mA 5 cm fókusztávolsággal, 210 r/perc dozisérté mellett és 5 cm Ø fémtubussal.

Az ultraibolya (UV) sugárzás előállítása 500 wattos HANNAU-típusú UV-csővet használtunk. Az UV. cső távolsága az ATP-oldat felszínétől 15 cm volt. Szűrőket nem alkalmaztunk. Állandó hűtésről gondoskodtunk, melynek következtében az ATP-oldat hőmérséklete 10 C° alatt maradt.

Kísérleti eredmények és következtetések

Kísérleteinkben 50 gamma/ml koncentrációjú ATP-oldatot (S-ATP), valamint üvegben desztillált vizet sugároztunk be azonos körülmények között. A besugárzott vízzel az ATP-törzsoldatból elkészítettük az állandóan használt 50 gamma/ml koncentrációjú ATP-oldatot (R-ATP). A nyert S-ATP és R-ATP-oldatok fényabszorpcióját és enzimatis hasíthatóságát összehasonlítottuk a kontroll ATP-vel.